

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Valor pronóstico de la densidad microvascular y de la expresión del VEGF, EGFR y HIF-1 α en pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado tratados con quimiorradiación

Prognostic role of microvascular density, VEGF, EGFR and HIF-1 α expression in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiotherapy

TREBALL DE RECERCA

Autor: Andrés Felipe Cardona^{1,2,*}

¹Grupo Oncología Clínica y Translacional, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, Colombia

²Laboratorio de Biología Molecular Tumoral, Fundación para la Investigación Clínica y Molecular del Cáncer (FICMAC), Bogotá, Colombia; investigador asociado ONCOLGroup

Director: Antonio Arellano Tolivar¹

¹Departamento de Radioterapia, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Barcelona, Cataluña, España.

Convocatoria: Septiembre 2011

Barcelona, 2011

Índice

1. Resumen y palabras claves	5
2. Abstract and key words	7
3. Introducción	8
4. Objetivos	17
5. Materiales y métodos	18
6. Resultados	21
7. Discusión	24
8. Conclusiones	28
9. Figuras y tablas	29
10. Agradecimientos	40
11. Referencias	41

Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Características de la población en estudio.	29
Tabla 2. Desenlaces principales después de la administración de la quimiorradiación.	32
Tabla 3. Expresión proteica en el tejido tumoral embebido en parafina y su relación con los principales desenlaces en estudio.	34
Tabla 4. Análisis multivariado para la supervivencia global (Modelo de Cox).	35
Figura 1. Supervivencia global y libre de progresión en la población general.	36
Figura 2. Supervivencia global según el tipo de respuesta a la quimiorradiación.	37
Figura 3. Supervivencia global según el tamaño tumoral (mayor y menor de 6 cm).	37
Figura 4. Supervivencia global según la expresión de EGFR.	38
Figura 5. Supervivencia global según la expresión de VEGF.	38
Figura 6. Supervivencia global según la expresión de HIF-1 α .	40
Figura 7. Supervivencia global según la densidad microvascular (DMV).	40

Listado de abreviaturas

DMV	Densidad microvascular.
TRG	Tasa de respuesta global.
SLP	Supervivencia libre de progresión.
SG	Supervivencia global.
VPH	Virus de papiloma humano.
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results.
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics.
NCI	National Cancer Institute, Estados Unidos
GOG	Gynecology Oncology Group.
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group.
LCR	Región no codificante de control.
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico.
IRF3	Regulador del factor 3 del interferón.
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular.
P1GF	Factor de crecimiento placentario .
TSP	Trombospondina 1.
IL8	Interleuquina 8.
TNFα	Factor de necrosis tumoral α .
MTD	Dosis máxima tolerada.
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events.
INC	Instituto Nacional de Cancerología, Colombia.
BACAF	Biopsia por aspiración con aguja fina.

Resumen

Introducción: Colombia cuenta con poca información sobre el comportamiento del cáncer, no obstante, el carcinoma de cuello uterino representa la segunda causa de muerte por la enfermedad entre las mujeres de nuestro entorno. El patrón epidemiológico de la enfermedad es preocupante porque los estados localmente avanzados constituyen el estado más frecuente al momento del diagnóstico y la mortalidad siendo bastante alta a pesar de la presencia de un programa de cribado organizado.

Objetivo: Describir el valor pronóstico de la densidad microvascular (DMV) y de la expresión proteica de varios genes relacionados con la supervivencia y proliferación del cáncer de cérvix localmente avanzado en un grupo de mujeres tratadas con quimiorradiación y braquiterapia intracavitaria. Se estimaron la tasa de respuesta global (TRG), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SG).

Resultados: Se incluyeron 61 mujeres con una edad media de 52 ± 10 años; todas tenían diagnóstico de cáncer de cérvix localmente avanzado (IIA 2.3%/IIB 47.5%/IIIA 4.9%/IIIB 37.7%/IVA 3.3%/no definido 3.3%), con un volumen tumoral promedio de 6.4cm (DE \pm 1.8cm) e infección por VPH en 46% de los casos; 58 sujetos (95%) tenían un patrón escamoso, dos fueron adenocarcinomas y >50% presentaba neoplasias moderada o pobremente diferenciadas. Todas fueron tratadas con quimiorradiación (interrupción transitoria en teleterapia por toxicidad y otras causas en 19% y 21.4%, respectivamente/media de ciclos de platino concomitante 4.8 series \pm 1.0) y braquiterapia (77% completaron el tratamiento intracavitario). La mediana para la SLP y global fue de 6.6 meses (r, 4.0-9.1) y 30 meses (r, 11-48), respectivamente. Ninguna de las variables tuvo un efecto positivo sobre la SLP, mientras el análisis multivariado demostró que los niveles de expresión del VEGF (P=0.026), EGFR (P=0.030), y el volumen tumoral menor de 6 cm (P=0.02) influyeron positivamente sobre éste desenlace.

Conclusión: Existe una influencia positiva sobre el pronóstico, de la tipificación en el cáncer de cérvix localmente avanzado tratado con quimiorradiación basada en platino.

Palabras clave:

Cáncer de cérvix, virus del papiloma humano, quimioterapia, radioterapia, expresión de genes, supervivencia

Abstract

Background: Colombia has limited data regarding cancer incidence but recent long-term data series showed that cervical carcinoma is the second leading cause of death among women in Colombia. The epidemiologic patterns are of particular concern because locally advanced disease and death rates have remained consistently high despite the presence of an organized screening program.

Objective: To describe the prognostic value of microvascular density (MVD) and the protein expression of several genes related to survival and proliferation of locally advanced cervical cancer (LACC). Overall response rates (ORR), clinical benefit (CB), progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) were estimated for the whole women suffering from LACC treated with chemoradiotherapy followed by high dose rate brachytherapy (HDRB) in Colombia.

Results: Sixty-one patients were included (mean age 52 ± 10 years); all of them had LACC (2.3% 2A/47.5% 2B/4.9% 3A/37.7% 3B/3.3% 4A/3.3% not defined), a tumour mean size of 6.4cm (SD ± 1.8 cm) and HPV infection in 46% of the cases. Fifty-eight patients (95%) had a squamous pattern, two were adenocarcinomas and >50% presented moderated or poorly differentiated neoplasias. All of them were treated with chemotherapy (transitory interruption in external radiotherapy was documented in 19% due to toxicity and in 21.4% of cases by other causes/mean cycles of platinum administered during radiotherapy 4.8 ± 1.0) and brachytherapy (77% completed all planned intracavitary treatment). The median PFS and OS was 6.6 months (range, 4.0-9.1) and 30 months (range, 11-48) respectively. None of the variables had a positive effect on PFS, whilst multivariate analysis revealed that VEGF ($p=0.026$) and EGFR expression levels ($p=0.030$) and less than 6 cm tumour volume ($p=0.02$) positively influenced the OS.

Conclusion: Classifying LACC patients treated with cisplatin-based chemoradiotherapy by protein expression had a positive influence on prognosis.

Key words: Cervical cancer, human papiloma virus, chemotherapy, radiotherapy, gene expression profile, survival

Introducción

El cáncer de cérvix es la segunda neoplasia en incidencia y mortalidad a nivel global; anualmente, esta enfermedad causa cerca de 234.000 muertes, de las cuales, 40.000 se presentan en mujeres provenientes de los países en vía de desarrollo (1). La discrepancia en la relación incidencia/mortalidad para el cáncer de cérvix entre los países con mayores y menores recursos económicos, es el resultado directo de la inversión marginal en los programas de cribado. La vacunación masiva dirigida contra el virus de papiloma humano (VPH) que se asocia con el desarrollo del 99% de las neoplasias invasivas del cérvix, podría reducir dramáticamente la morbilidad y mortalidad de esta neoplasia (2). No obstante, el elevado costo de las vacunas y las barreras políticas y logísticas para su inclusión, retrasarán la implementación universal de la inmunización en los países en desarrollo (2). De igual forma, las vacunas dirigidas contra el VPH que se encuentran disponibles sólo son efectivas contra los serotipos que originan el 70% de los cánceres (3).

En los Estados Unidos al igual que en otros países del primer mundo, la mayoría de los cánceres de cérvix se diagnostican en estado temprano (4,5). De los 13.458 pacientes con cáncer de cérvix incluidos en el SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) entre 1973 y 1987, el 71% tenía neoplasias estados I a IIA según la clasificación FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (4). La gran mayoría de los países de América Latina, incluyendo Colombia están viviendo una transición social y demográfica; los cambios más significativos en las tasas de mortalidad global en las últimas décadas, incluyen una reducción continua en los decesos infantiles y un incremento en las muertes entre los hombres menores de 45 años (6). Estos factores, en combinación con el envejecimiento de la población y su incremento global han favorecido el aumento proporcional de las mujeres, en especial, de aquellas mayores de 65 años (6). Dichas variaciones poblacionales, han tenido profundos efectos en el comportamiento de las enfermedades crónicas y en la demanda de los servicios sanitarios (7).

Nuestro país tiene información limitada respecto del comportamiento epidemiológico de las neoplasias más frecuentes, pese a esto, es claro que el cáncer de cérvix representa la segunda causa de muerte por esta enfermedad entre las mujeres en Colombia (6). La distribución por estados en el país es especialmente preocupante, en particular, por que el 60% de los casos incidentes corresponden con lesiones localmente avanzadas (5-7).

La gran mayoría de las mujeres con neoplasias tempranas se curan con cirugía radical con o sin la administración de radioterapia complementaria; sin embargo, las pacientes con tumores localmente avanzados (estados II a IIIB) presentan un riesgo mayor de progresión. En este subgrupo la radioterapia como intervención única permite controlar la enfermedad en el 35% a 65% de los casos (8). La administración concomitante de la teleterapia pélvica con la quimioterapia permite incrementar el control del crecimiento tumoral, induciendo un daño subletal sobre la célula, al afectar la capacidad para reparar el ADN, hecho que ocasiona profundos cambios en su metabolismo. De la misma manera, afecta el tamaño tumoral siguiendo una relación directa entre la dosis y la respuesta, que favorece la disminución en la oxigenación tisular, la inhibición de la angiogenesis y la promoción de la apoptosis al incrementar la radiosensibilidad (9,10).

En 1999, el National Cancer Institute (*NCI, United States of America*) recomendó el uso concurrente del cisplatino con la radioterapia como estándar para el tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado basado en los resultados de la integración de cinco estudios clínicos fase III con asignación aleatoria (11); de estos, dos fueron realizados de forma exclusiva en mujeres con enfermedad temprana (estados IA, II, IB y IIA) e incluyeron el uso preoperatorio y postoperatorio de radioterapia como parte del control. En los tres estudios restantes publicados por el *Gynecology Oncology Group* (GOG) y por el *Raditation Therapy Oncology Group* (RTOG) se incluyeron un gran número de pacientes con estados IIIB, III y IVA. Estos experimentos encontraron un beneficio uniforme con el uso de la quimiorradiación que otorga un incremento absoluto en la supervivencia global a cinco años del 12% (12).

Virus del papiloma humano (VPH) y carcinoma de cérvix

El VPH es un virus ADN circular de 8-kb que tiene como blanco específico las células basales de los epitelios de las mucosas; su familia está constituida por más de 100 genotipos que se clasifican de acuerdo con las células que infectan, y su capacidad para generar modificaciones complejas en la información del hospedero. Algunos subtipos como el VPH1, infectan las células de los estratos córneos en la piel, mientras que los subtipos 6, 11, 16 y 18 comprometen la mucosa de la cavidad oral, la orofaringe, el tracto anogenital, y el cérvix. Los tipos de bajo riesgo generan lesiones benignas, en contraposición a sus homólogos de alto riesgo que ocasionan neoplasias.

El genoma del VPH está comprimido en genes tempranos y tardíos así como en regiones no codificantes, todos ellos, activos en los procesos de replicación, transcripción y carcinogénesis. Los marcos de lectura tardía codifican las proteínas de la cápside L1 y L2 que se transcriben solo en las células infectadas. Los primeros marcos de lectura (E) codifican de forma abierta las proteínas E1, 2, 5, 6 y 7, vinculados en la regulación de la replicación y en la expresión de otros genes. Al menos tres proteínas (E5, E6 y E7) codificadas por los virus de alto riesgo se consideran oncogénicas debido a su capacidad para inducir la transformación y el crecimiento de las células anormales. Estas moléculas proteicas tienen la capacidad de regular la función de los genes supresores de tumor mediante la derogación de la actividad de las proteínas p21, p53 y pRb, eventos que resultan en la alteración de la apoptosis, en defectos relacionados con la reparación del ADN y del control del ciclo celular (13-15).

La región no codificante de control (*LCR*) contiene sitios de unión para las proteínas C2 y E1 localizadas cascada arriba en la secuencia del promotor p97 que controla la transcripción de las oncoproteínas E6 y E7. De igual forma, existe una regulación dependiente de la expresión de las proteínas E6 y E7 por la E2, capaz de reprimir el efecto de estas dos. Desde que se reconoció el efecto de la infección persistente de los genotipos de alto riesgo del VPH sobre la probabilidad de desarrollar cáncer de cérvix se descubrió la capacidad de adhesión lineal del genoma del virus en los cromosomas del huésped, evento que suele ocurrir de forma tardía. La integración del genoma viral es al azar y ocurre con mayor predilección en los sitios donde hay cierta fragilidad. Dicha unión, se produce gracias a la interrupción en la secuencia del gen E1/2 lo que produce sobreexpresión de E6 y E7 que conducen a la alteración de las principales vías supresoras de tumor (14,15).

El marco abierto de E5 se transcribe a partir de la fórmula episómica del ADN viral y ejerce efectos procancerígenos durante las primeras etapas de la infección sin que su presencia sea necesaria para mantener el fenotipo maligno. Sin embargo, se ha demostrado que la proteína E5 estimula el crecimiento celular a través de la activación y regulación del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), hecho que conduce hacia la señalización anormal generando la sobreexpresión de algunos protooncogenes y la represión de la quinasa dependiente de ciclinas 1A (CDKN1A/p21).

La proteína viral E6 tiene capacidad para estimular el crecimiento celular a través de varios mecanismos diferentes, entre ellos, la unión con la proteína asociada a E6 (E6-AP), el p53 y el complejo inhibitorio del proteosoma. Todos estos eventos ocasionan la inhibición de la apoptosis en un punto ineficiente de la fase G1/S, donde se realiza el control al daño del ADN que tras la infección por el VPH genera inestabilidad cromosómica en las células infectadas. El complejo E6/E6-AP también evita la degradación de la familia SRS y BLK, lo que resulta en la estabilización de las formas activas de estas quinasas estimulando así la mitosis. Las proteínas E6 del serotipo 16 activan o inhiben varios blancos celulares adicionales entre los que se incluyen la Paxilina, la transcriptasa inversa de la telomerasa (hTERT), la oncoproteína MYC y el regulador del factor 3 del interferón (IRF3), que actúa como transactivador de todos los interferones. De igual forma, se altera la capacidad de reparar el ADN de cadena sencilla a través del XRCC1 (14,15).

La proteína E7 del VPH es capaz de degradar el RB por la ubiquitinación y la inactivación funcional de la proteína, este hallazgo conduce a la sobreexpresión de la ciclina dependiente de quinasa p16 y NK4A; la detección de la sobreexpresión del p16 es considerada como un marcador indirecto de infección por VPH en el que juega un importante papel la hiperproliferación celular. También está implicado en cambios documentados en las vías PLK1, con la aurora quinasa A, CDK1 y NEK2 (14-20).

VPH y cáncer de cérvix: relación con la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y proliferación celular (EGFR, VEGF, HIF-1a y densidad microvascular)

La familia de proteínas relacionadas con el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) representa un grupo heterogéneo de elementos relacionados con el estímulo y aumento de la permeabilidad vascular, el crecimiento de las células endoteliales, su migración y diferenciación (21). Otros miembros adicionales de esta superfamilia son el factor de crecimiento placentario (P1GF, *Placental Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. La sobreexpresión del VEGF se ha correlacionado con un peor pronóstico en los pacientes con carcinoma escamoso de cérvix y sus niveles en suero representan un marcador subrogado del

crecimiento tumoral. Evaluaciones colposcópicas del cérvix han encontrado vasos sanguíneos atípicos con formas irregulares y aumento de la densidad microvascular (DMV cuantificando la expresión de CD31) que caracteriza un fenotipo más agresivo (22).

La oncoproteína E6 del VPH media la inactivación del p53 promoviendo la sobreexpresión de VEGF, modulando la angiogénesis y vasculogénesis a través de la inhibición de la expresión del TSP1 (Thrombospondina 1); esta última es una glicoproteína de adhesión que facilita la interacción entre las células y su matriz a nivel de estroma, permitiendo la unión de moléculas como el fibrinógeno, la fibronectina, la laminina, el colágeno tipo 5 y las integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$, importantes en la génesis del carcinoma de cérvix. Recientemente, Randall y colaboradores describieron la relevancia pronóstica de la densidad microvascular detectada por inmunohistoquímica en una muestra de especímenes recolectados en un experimento clínico fase III que incluyó mujeres con cáncer de cérvix tratadas con quimiorradiación. Este estudio demostró que una alta expresión de CD31 representa un factor pronóstico independiente que se asocia con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) y global (SG). (22). En contraposición, Obermair reportó que el aumento en la DMV se asoció con un desenlace negativo al documentar una reducción en la tasa de supervivencia global a 5 años entre las mujeres que tuvieron un recuento mayor a 20 vasos por campo de gran aumento cercano al 35% (23). La inconsistencia de los resultados en estos y otros estudios puede ser explicada por la heterogeneidad de la población evaluada, por el método de detección utilizado, por la estrategia para cuantificar la DMV, y por las diversas intervenciones usadas. (24,25)

El aumento en la DMV se asocia con la alteración de otros marcadores derivados del endotelio vascular como el factor VIII, el CD34, la interleuquina 8 (IL8), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el VEGF. Un estudio que valoró 117 mujeres con carcinoma de cérvix estado IB2, encontró una relación directa y proporcional entre la expresión de VEGF, la invasividad tumoral, el compromiso ganglionar y el volumen de la neoplasia. (26). La intensidad de la expresión del VEGF cuantificada por inmunohistoquímica se correlacionó de forma negativa con la SG, hallazgo que confirmaron Gaffney y colaboradores al demostrar una asociación estadísticamente significativa entre este marcador y el compromiso de la SLP (27).

El gen VEGF-A (región cromosómica 6p21.3) da lugar, por “splicing” alternativo del ARNm, a cinco isoformas distintas que corresponden a las proteínas de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos. Se han identificado otras moléculas estructuralmente relacionadas con el VEGF que se unen a sus mismos receptores, como son PDGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, y el homólogo viral VEGF-E. El VEGF165, de solubilidad y afinidad por la matriz extracelular intermedias entre el VEGF121 y el VEGF189, es la isoforma más abundante, y es producido por una gran cantidad de tipos celulares. Estructuralmente, el VEGF165 es una glicoproteína homodímera de 45 KDa, básica y con dominios de unión a la heparina, siendo por lo tanto parcialmente soluble lo que facilita su retención en la superficie celular y en la matriz extracelular.

La tensión de oxígeno tiene un papel crítico en la regulación de la expresión génica del VEGF. El HIF-1 es el regulador principal de la respuesta transcripcional secundaria a la hipoxia, aunque otros factores de transcripción, como AP-1, SP-1 y NF κ B, tienen sitios de unión en la región del promotor de VEGF. Además, otras citoquinas y alteraciones tumorales pueden activar la expresión de VEGF, como las mutaciones del gen Ras, la inactivación del gen von Hippel-Lindau, o las mutaciones en el p53. El VEGF se une, al menos, a tres receptores de tipo tirosin-quinasa y a una proteína de membrana llamada neuropilina. Los tres receptores se denominan VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4). Los dos primeros se encuentran en el endotelio vascular, y el último se expresa exclusivamente en los linfáticos. La señal del VEGF transmitida a través de estos receptores es capaz de fosforilar al menos 11 proteínas de las células endoteliales y tumorales. El VEGFR1 presenta una respuesta débil a la fosforilación y aparentemente media algunas señales que regulan la migración celular. La interacción del VEGF con el VEGFR2 activa la proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto celular. Además, el VEGF no sólo activa un programa de proliferación en el endotelio, también pone en marcha propiedades citoprotectoras específicas, descritas hasta ahora en los capilares en desarrollo y en las neoplasias; estos cambios son promovidos por la vía PI3K/Akt. (28-30)

Varios estudios han relacionado la sobreexpresión del VEGF con el potencial de metástasis y con la posibilidad de respuesta a la quimiorradiación en diversas neoplasias ginecológicas. Bachtary informó una mayor probabilidad de falla local y a distancia en mujeres con cáncer de cérvix que tuvieron niveles elevados de VEGF en plasma

(mayores de 244 pg/ml), evento que se relacionó con un aumento en la expresión proteica cuantificada antes de la administración de la radioterapia. De igual forma, Zusterzeel concluyó que la elevación en los niveles circulantes de VEGF se asoció con un mayor estado tumoral, con la posibilidad de documentar un tumor mayor de 2 cm y con una probabilidad superior de evidenciar la presencia de los subtipos más agresivos del VPH. (31)

La proliferación de las células en los tumores cervicales también depende de una interacción dinámica con su microambiente, en particular con las estructuras vasculares, este entorno mantiene un avance irregular entre las señales que favorecen a la proliferación y aquellas que la reprimen, evento que representa en parte una clave para controlar la angiogénesis y la homeostasis en dichas neoplasias. Varios estudios han demostrado que la hipoxia aumenta el flujo en las arterias uterinas beneficiando el consumo de glucosa y la alteración en la densidad capilar. La hipoxia también representa uno de los principales indicadores para el control de las células progenitoras normales y tumorales. En el cáncer de cérvix la hipoxia modifica el gradiente de oxígeno de múltiples sustancias quimiotácticas, y de otras proinflamatorias que favorecen la producción de HIF-1 α . (32,33)

Por otra parte, Liu y colaboradores encontraron que la sobreexpresión de HIF-1 α promueve la radioresistencia a través de la supresión de la expresión de Bax (34), efecto que es motivado por la producción de las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. (35). Dellas y colaboradores investigaron la relación entre la expresión de HIF-1 α cuantificada por inmunohistoquímica, la oxigenación tumoral y los niveles de hemoglobina en una cohorte de pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con radioterapia; el estudio documentó que las pacientes con especímenes negativos para el HIF-1 α tuvieron una mejor SG a 5 años, hallazgo que se asoció con una menor fracción intratumoral de pO₂ (<5 mmHg) (36). Estos datos han sido corroborados por múltiples estudios que han evaluado la inmunoreactividad para el HIF-1 α en pacientes con cáncer de cérvix y su impacto sobre los desenlaces más relevantes (37-39)

Dado que la angiogénesis se encuentra claramente relacionada con el desarrollo y la progresión del cáncer de cérvix, varios estudios han evaluado la eficacia y seguridad de agentes como el bevacizumab en mujeres con enfermedad recurrente o metastásica. Este

agente demostró una tasa de respuesta del 11% y una proporción baja de pacientes sin progresión de la enfermedad después de 6 meses de iniciada la intervención (40). Algunos reportes adicionales soportan el uso de este y otros antiangiogénicos en combinación con carboplatino y paclitaxel como parte del tratamiento sistémico del carcinoma de cérvix avanzado (41-43)

El receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) pertenece a la familia de receptores localizados en la membrana plasmática que presentan actividad tirosin-quinasa intrínseca. En humanos, el gen que codifica el EGFR (c-erbB1) se encuentra en el brazo corto (región p13-p12) del cromosoma 7 y está compuesto por 28 exones que ocupan un segmento de 75 kb. Este gen codifica una proteína precursora de 1.210 aminoácidos que posee una corta secuencia líder hidrofóbica en su extremo N-terminal que usa para su inserción en la membrana, siendo posteriormente eliminada por procesamiento proteolítico. El receptor maduro es una glicoproteína integral de membrana de 170 kDa que está constituida por un dominio extracelular amino terminal, un único dominio transmembrana y un dominio citoplásmico carboxilo terminal en el que se localiza el sitio catalítico responsable de la actividad tirosin quinasa. Algo más de la mitad de la cadena polipeptídica del EGFR forma su dominio extracelular. Este dominio, que contiene múltiples residuos N-glicosilados ricos en manosa, presenta dos zonas en las que existen un gran número de residuos de cisteína, entre las que se encuentra el sitio de unión del ligando. Este sitio es específicamente reconocido por una familia de factores de crecimiento que poseen módulos estructurales semejantes al del EGF (*Epidermal Growth Factor*), su ligando prototipo. Las cadenas glicosílicas del receptor parecen estar implicadas en el correcto plegamiento del mismo y en su transporte a la superficie celular. El dominio transmembrana, como otros segmentos proteicos helicoidales que atraviesan membranas biológicas, es rico en aminoácidos hidrofóbicos; este dominio juega un papel fundamental en la transmisión de información a través de la membrana plasmática, ya que comunica el sitio de unión del ligando extracelular con el sitio catalítico tirosin quinasa intracelular. En el dominio citoplásmico del EGFR se encuentra localizado el sitio catalítico responsable de su actividad tirosin quinasa. En este dominio se encuentra un residuo de lisina (Lys721), que está implicado en la unión del ATP al receptor, y cinco residuos de tirosina (Tyr992, Tyr1068, Tyr1086, Tyr1148 y Tyr1173) en su extremo más distal, que son susceptibles de ser transfosforilados después de producirse la dimerización del receptor. Los residuos de

fosfotirosina así generados sirven como sitios de reclutamiento y anclaje de proteínas que contienen dominios SH2 (Src homology domain-2) o dominios PTB (phospho-tyrosine-binding domains) que inician múltiples vías de señalización intracelular. (44,45)

El EGFR se encuentra alterado en el 80% de los carcinomas escamosos de cérvix; Noordhuis y colaboradores demostraron recientemente que la sobreexpresión del EGFR en mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con quimiorradiación se asoció de forma negativa con la SLP. Además, la inmunoreactividad del EGFR y de su fracción fosforilada fueron útiles para predecir la respuesta al tratamiento de forma independiente al estado tumoral y al patrón histológico dominante. Esta asociación puede explicarse, al menos en parte, por el papel que tiene el receptor en el proceso de reparación del daño ocasionado sobre el ADN vía activación de la cascada de señalización PI3K/Akt. (46)

Varios estudios preclínicos y clínicos han demostrado que los inhibidores de tirosinquinasa actúan como radiosensibilizantes mejorando el control local de las enfermedades tumorales cuando se comparan con la radioterapia como intervención única (47). Recientemente, un estudio fase I demostró la dosis máxima tolerada (MTD) y la seguridad del erlotinib combinado con cisplatino y radioterapia pélvica para el manejo del carcinoma de cérvix localmente avanzado (48). El tratamiento con el inhibidor no generó radiodermatitis o diarrea limitante, y la gran mayoría de los pacientes presentaron toxicidad menor (33% y 66% presentaron radiodermatitis y diarrea grado 1-2, respectivamente), motivo por el cual se seleccionó la dosis de 150 mg/día que se administra durante la teleterapia y la braquiterapia endocavitaria. Posteriormente, se presentaron los resultados de la fase II del mismo trabajo que incluyó 34 pacientes entre los que se encontró toxicidad menor, una tasa de respuesta completa del 91,3% (IC95% 70,5 a 98,5) y parcial del 8,7% (49). Después de una mediana de seguimiento de nueve meses (rango 3 a 25), ninguno de los 23 pacientes evaluables había progresado, datos que indicaron que la combinación de la quimiorradiación mas el erlotinib mejora de forma significativa los resultados obtenidos con el tratamiento histórico estándar.

A continuación se explora el valor pronóstico de varios marcadores proteicos relacionados con la proliferación y angiogénesis en pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con quimiorradiación.

Objetivos

Primario

- Valorar el papel pronóstico de la densidad microvascular y de la expresión proteica (cuantificada por inmunohistoquímica) de múltiples genes (VEGF, EGFR y HIF-1a) relacionados con la supervivencia y proliferación del carcinoma de cérvix localmente avanzado tratado con quimiorradiación, seguida de braquiterapia endocavitaria en una cohorte de mujeres Colombianas.

Secundarios

- Describir las características clínicas y demográficas de una población de mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas con el esquema estándar de manejo en Colombia.
- Describir el estado de la expresión proteica de varios genes relevantes en el comportamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado cuantificando su valor por inmunohistoquímica.
- Plantear hipótesis respecto de la relevancia terapéutica de varios genes asociados con la supervivencia y proliferación celular en el carcinoma localmente avanzado de cérvix con la intención de explorar mecanismos novedosos de tratamiento.

Materiales y métodos

Pacientes

La información extraída de las historias clínicas de 61 mujeres con cáncer de cérvix localmente avanzado tratadas en Bogotá, Colombia con quimiorradiación fueron valoradas de forma independiente por el investigador quien registró los datos en un formato diseñado para el estudio; luego fueron digitados en una base de datos donde se examinaron usando el paquete estadístico SPSS® 11.0. Se consideraron y analizaron diversas variables clínicas (edad, grado de escolaridad, historia de exposición al humo por combustión del tabaco, número de años de consumo de tabaco, historia de infección por VIH o de lesiones preneoplásicas previas, el estado funcional basal cuantificado por el índice de Karnofsky, la histología y gradación tumoral, el estado tumoral, las dimensiones del primario en cm, la presencia de ganglios pélvicos sugestivos de compromiso metastásico, el esquema y dosis de la radioterapia pélvica y de la braquiterapia intracavitaria, la dosis y el número de ciclos de quimioterapia con cisplatino), la toxicidad de las intervenciones (cuantificada según el *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events* - CTCAE, version 3.0, United States) (50), el estado al final del seguimiento (viva o muerta, con o sin enfermedad) y diversos desenlaces como la TRG, SLP, la SG y la mortalidad (para la valoración de estos desenlaces se utilizaron los criterios RECIST 1.1). (51)

Inmunohistoquímica

Determinación de la expresión del VEGF

Se cortaron secciones de parafina de un grosor de 5 μ m, se montaron en portaobjetos de cristal recubiertos de APES (3-aminopropiltrietoxisilano), desparafinizaron y luego fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 0,3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, se recuperó el antígeno por inmersión de las preparaciones en un tampón citrato 0,01 (citrato monohidratado 10 mM en agua destilada, pH=6,0). Después, se enfriaron las preparaciones durante 15 minutos, se incubaron durante 30 minutos con suero normal de conejo (NRS, X-0902 DAKO, Carpinteria, CA, USA), se diluyeron al 1,5 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para reducir la

tinción inespecífica de las zonas vecinas y se incubaron las preparaciones durante 60 minutos con VEGF antihumano (anticuerpo policlonal, AB-293-NA, sistemas R&D, Oxford, Reino Unido) diluido al 1:100 en PBS. Después de tres lavados con PBS, las preparaciones se incubaron con anticuerpos biotinilados anticabra/conejo (RAG, E-0466 DAKO, Carpinteria, CA, USA) diluido en 1:350 durante 30 minutos. Posteriormente, se expusieron al complejo peroxidasa biotina-estreptavidina (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos y se utilizó como cromógeno el tetracloruro de diaminobencidina (DAB) (SIGMA, Poole, Dorset, Reino Unido).

Se realizó la contratinción con hematoxilina de Mayer. Una preparación positiva sirvió como control significativo, y como control negativo se utilizó la omisión del anticuerpo primario. Para la evaluación de la expresión del VEGF se siguieron los métodos de puntuación general descritos previamente por Kimura y colaboradores (52). En resumen, usando un aumento de 200 (cámara de 0,12 mm²), la expresión de VEGF se graduó semicuantitativamente en dos grupos: <10% y \geq 10% de células tumorales teñidas como expresión negativa y positiva, respectivamente.

Determinación de la expresión del EGFR

Siguiendo el proceso descrito para el tratamiento del tejido tumoral embebido en parafina se realizó la tinción para el EGFR usando el anticuerpo policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) IgG de conejo dirigido contra el receptor. El anticuerpo se diluyó 1:100 en PBS. Como controles positivos se emplearon muestras de carcinomas de mama y los controles negativos se realizaron con el mismo tejido del cérvix sin exposición al anticuerpo. Los casos se consideraron como positivos si la tinción fue al menos 2 veces superior (2+) en una escala de 1 a 4+, y si el 10% o más de las células tumorales estuvieron teñidas sobre el trasfondo sano o sobre el control negativo.

Determinación de la expresión del HIF-1 α

El tejido embebido en parafina se expuso al anticuerpo monoclonal anti-HIF1 α (H72320; BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) evaluando la expresión nuclear de forma semicuantitativa siguiendo el porcentaje de células afectadas y la intensidad de la tinción. Los casos con menos del 10% de células positivas se consideraron negativos, y

el resto fueron positivos, valorando la reactividad como débil (11%-50%), moderada (51%-80%) y fuertemente positiva (>80%). Las áreas con necrosis fueron descartadas, excepto si presentaban formaciones tumorales adyacentes.

Determinación de la densidad microvascular

Las células endoteliales se tiñeron con CD31 (anticuerpo monoclonal, clon JC/70A, isotipo IGG1, kappa, M-0823, DAKO, DAKO, Carpinteria, CA, USA) en una dilución 1/40 (53). La densidad de los vasos sanguíneos se determinó en zonas con gran vascularización, en función de los criterios propuestos por Wedner y colaboradores (54). En estas zonas, la densidad de la microvasculatura se midió por un analizador digital de imágenes (aumento de 200 y campo de 0,24 mm², como fue descrito previamente por Tjalma y colaboradores (53).

Análisis estadístico

Los resultados se obtuvieron y describieron por medio de la determinación de frecuencias absolutas, relativas, medidas de tendencia central y de dispersión. El cruce de variables se realizó con tablas de contingencia sometidas a pruebas de dependencia y asociación usando el estadístico Ji al cuadrado (X^2) o el test exacto de Fisher cuando fue necesario. Para todos los casos, el nivel de significancia fue $p < 0,05$. Las estimaciones de supervivencia se hicieron utilizando el modelo no paramétrico del límite del producto (método de Kaplan-Meier), y sus funciones se compararon mediante la prueba Log-rank. Con el fin de valorar los factores que influyeron sobre la supervivencia se realizó un análisis multivariado utilizando el modelo proporcional de Cox ("stepwise model").

Resultados

En el estudio se incluyó un total de 61 mujeres con edades entre los 29 y 75 años que fueron tratadas en una institución de cuarto nivel en Bogotá, Colombia. El 92% de la población tenía menos de 65 años, la gran mayoría presentaba un estado funcional basal cuantificado por el índice de Karnofsky mayor al 70%, y el 61% tenía algún grado de escolaridad básica o superior. Cerca de la mitad de los sujetos en estudio no presentaban antecedentes de exposición al humo por combustión del tabaco, y en las 12 mujeres que reportaron ser fumadoras, la media de años de consumo fue de doce. En el 47% de los casos no fue posible obtener datos referentes a estudios de cribado previos, y sólo se evidenció positividad para el VPH en una mínima cantidad de mujeres (n=7); ninguna tenía historia de infección por VIH.

La histología dominante fue el carcinoma escamoso (n=58) y más de la mitad de los tumores fueron moderadamente y mal diferenciados. Al valorar la distribución según el tamaño tumoral se encontró que el 51% de las mujeres (n=31) presentaban lesiones con un volumen superior a los 6 centímetros; según la clasificación FIGO, al momento del diagnóstico el 2.3%, 47.5%, 4.9%, 37.7% y 3.3% tenían lesiones estados IIA, IIB, IIIA, IIIB y IVA, respectivamente. Sólo una minoría de los casos tuvo evaluación invasiva de los ganglios pélvicos que fueron positivos en 5 mujeres. La Tabla 1 resume las características principales de la cohorte en estudio.

En 25 pacientes se interrumpió la teleterapia de forma no programada debido a toxicidad (principalmente por diarrea/12 casos y por cistitis actínica/4 casos) y en 12 mujeres se detuvo el tratamiento por limitaciones asistenciales de orden administrativo.

El 75% de las pacientes completó la braquiterapia de alta tasa y el número promedio de series de cisplatino administrados durante la concomitancia fue de 4 (DE \pm 1). Después de

finalizar el tratamiento oncológico, el 47% de las pacientes había logrado respuesta clínica imaginológica completa, y el 25% parcial. Sólo en 8 casos se documentó enfermedad estable o en progresión, y en 9 mujeres fue imposible obtener información referente al resultado final del tratamiento. La mediana de seguimiento fue de 13.2 meses, periodo en el cual se encontró progresión de la enfermedad en 31 casos. En la Tabla 2 se encuentran discriminados los desenlaces después de la administración de la quimiorradiación y de la braquiterapia endocavitaria.

La SG y la SLP en la población general fueron 30.2 (IC95% 11.6-48.8) y 6.6 meses (IC95% 4.0-9.1), respectivamente (Figuras 1 y 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al discriminar la SLP según el tamaño tumoral (8.7 meses para las lesiones menores de 6 centímetros y 9.1 meses para las mayores de 6 centímetros; $p=0.85$), pero si al valorar la SG según esta variable (71 meses para las lesiones menores de 6 centímetros y 24 meses para las mayores de 6 centímetros; $p=0.02$) (Figura 3). La SLP ($p=0.0001$) y la SG ($p=0.0001$) fueron significativamente superiores entre las pacientes que lograron respuesta imaginológica completa; relación que no fue positiva para la SLP según el grado tumoral ($p=0.23$), pero si para la estadificación siguiendo la clasificación FIGO (mayor tiempo sin evidencia de progresión entre los pacientes con lesiones estados IIA y B; $p=0.004$). Los hallazgos fueron similares para la SG que también fue influenciada por el estado tumoral ($p=0.01$).

El 50.8% de las mujeres tuvo una alteración en la DMV, evento que no fue dominante para las lesiones de mayor gradación ($p=0.26$), en aquellas con un estado tumoral superior a II ($p=0.35$) o en las que midieron más de 6 cm ($p=0.13$). No hubo relación entre una DMV anormal y el tipo de respuesta ($p=0.38$), pero si una tendencia positiva a que la infiltración vascular fuera dominante en el segmento de mujeres menores de 50 años ($p=0.06$). El 88% y 62% de las mujeres con DMV alterada tuvieron una alta expresión de VEGF y HIF1, respectivamente; en las mujeres con mayor reactividad para los genes relacionados con angiogénesis se encontró una relación positiva para los cambios estructurales valorados por la DMV ($p=0.027$). La DMV no modificó la SLP ($p=0.60$) ni la SG ($p=0.66$).

El 46% de las pacientes presentaron inmunoreactividad para EGFR sin que este hallazgo fuera modificado por el tamaño tumoral ($p=0.49$), el estado ($p=0.40$), y el grado histológico

($p=0.12$). El 57% de las pacientes con expresión positiva de EGFR tuvieron una alta reactividad para el VEGF evento que se relacionó en esas 16 mujeres con un impacto negativo sobre la SG ($p=0.0001$)

El 50% de las pacientes tuvieron una expresión anormal del HIF siendo mayor entre quienes presentaban neoplasias moderadamente diferenciadas, tumores en estado IIIb, con elevación en el VEGF y la DMV; entre estos, hubo una correlación estadísticamente significativa para el ligando del VEGFR ($p=0.04$), y para la expresión del CD31 ($p=0.03$).

El 31% de los sujetos en estudio no presentó ninguna de las 4 alteraciones evaluadas, mientras el 20%, 13%, 16% y 18% tuvieron 1, 2, 3 y 4 anormalidades, respectivamente. En conjunto la presencia de 2 o más alteraciones no influyó sobre la SLP ($p=0.50$) ni sobre la SG ($p=0.53$).

La expresión anormal del EGFR, del VEGF y del HIF-1 α , modificaron el curso de la SG sin afectar la SLP (Figuras 4 a 6). La Tabla 3 incluye los resultados para los desenlaces según la expresión proteica en el tejido tumoral embebido en parafina. Al término del seguimiento el 57% de las mujeres había muerto, evento influenciado en el análisis multivariado de riesgos proporcionales por la expresión del EGFR y del VEGF (Tabla 4). En 33 casos la causa de muerte estuvo relacionada con la progresión de la enfermedad especialmente a nivel locoregional, y en 2 mujeres, fue imposible determinar el origen de este hecho.

Discusión

El cáncer de cérvix es considerado en la actualidad como un problema de salud pública a nivel global, con una elevada incidencia entre la población de mujeres de los países en vía de desarrollo, principalmente, en los subgrupos de menor nivel socioeconómico y con pobre hábito de higiene personal. Entre los años 2002 y 2006 el INC (Instituto Nacional de Cancerología, Colombia) ubicó a las neoplasias del cérvix en el primer lugar de incidencia, lo que se traduce en cerca de 5600 casos/año o en 26 por 100.000 mujeres durante el mismo periodo (55). Además, dicho tumor explica el 12% de las muertes por patologías crónicas entre la población de mujeres menores de 45 años (7). La gran mayoría (aproximadamente el 60%) de los casos hallados en nuestro entorno se encuentran agrupados entre las lesiones localmente avanzadas que requieren tratamiento con quimiorradiación usando cisplatino como coadyuvante. Múltiples estudios han intentado mejorar las tasas de respuesta global y la SLP y SG en esta población utilizando medicamentos que permitan bloquear nuevos blancos moleculares alterados por amplificación, sobreexpresión o mutaciones que favorecen la supervivencia y proliferación celular (56).

Una revisión sistemática que agrupó 25 experimentos clínicos (n=3452) demostró que la administración de quimiorradiación versus radioterapia sola reduce el riesgo de muerte en un 19%, lo cual se traduce en un beneficio sobre la SG a 5 años que oscila alrededor del 10% a 12% (57). El presente estudio encontró una tasa de respuesta imaginológica similar a la descrita previamente en la literatura, al igual que una SG a 3 años del 66%, cifra muy similar a la hallada en los estudios que sirvieron para estandarizar el tratamiento concomitante en la población de mujeres con neoplasias localmente avanzadas (58).

Los tumores de cérvix son el resultado de la expresión alterada de múltiples genes modificados por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH. Achary y colaboradores, determinaron que las diferencias en la expresión génica de las células tumorales en el cérvix predicen la radio y quimiosensibilidad; los cambios en 52 genes conductores

determinaron el comportamiento biológico de los tumores escamosos, siendo dominantes algunos como el EGFR, el VEGF, el HIF-1 α y 2 α , el HYAL2 (*hialuronoglucosanimidasa 2*), el SV2A (*synaptic vesicle glycoprotein 2A*) y las caspasa 10 (59,60).

El EGFR se encuentra alterado en más del 80% de las pacientes con cáncer de cérvix, hallazgo que ha estimulado la evaluación de terapias dirigidas contra el dominio externo del receptor (cetuximab, matuzumab y panitumumab); de igual forma, se han valorado diversos inhibidores tirosin-quinasa con resultados divergentes (erlotinib, gefitinib, lapatinib). Las alteraciones en este receptor se han asociado a pobre pronóstico debido a la capacidad para modular la respuesta del cáncer a la quimio y radioterapia. Liang y colaboradores determinaron que la teleterapia aumenta la biodisponibilidad y externalización del receptor, por lo que su bloqueo podría explicar el aumento en la respuesta de las mujeres con cáncer de cérvix expuestas a medicamentos dirigidos contra este blanco. (61) Varios estudios, han demostrado el sinergismo de algunos agentes citostáticos tradicionales con el erlotinib sobre diversos linajes incluyendo la célula multiresistente del cáncer de cérvix 518A2. (62,63) La evaluación de mujeres con cáncer de cérvix en Colombia encontró una expresión elevada del EGFR en el 46% de la población, hallazgo que no fue determinante sobre la SLP, pero que modificó positivamente la SG en el análisis uni y multivariado. En concordancia, la elevación en la expresión del EGFR se asoció con una mayor DMV ($p=0.016$), con un aumento significativo en el VEGF ($p=0.0001$), y con la elevación en el HIF-1 α ($p=0.0001$). Por el contrario, no hubo asociación entre el tamaño tumoral y la calificación del EGFR por inmunohistoquímica ($p=0.89$).

Varios estudios clínicos han demostrado la utilidad creciente de diversos compuestos dirigidos contra el EGFR en pacientes con carcinoma escamoso y adenoescamoso de cérvix. Los más promisorios y avanzados se han publicado con erlotinib (47-49), sin embargo también se han evaluado el cetuximab como monoterapia (GOG-0227E), en conjunto con radioterapia pélvica (GOG-9918), y en asociación con cisplatino en tumores recurrentes (GOG-0076DD). Sólo un estudio valoró la utilidad del gefitinib como segunda o tercera línea en pacientes con enfermedad avanzada (64-66).

El análisis de la expresión de múltiples genes relacionados con la angiogénesis, vasculogénesis y linfangiogénesis ha permitido entender la biología y el control celular en

distintas neoplasias incluyendo el cáncer de cérvix. Lebrecht, Ueda y colaboradores reportaron que el estado del VEGFR incide sobre la respuesta y progresión en pacientes con enfermedad localmente avanzada (67,68); del mismo modo, el GOG observó que un aumento en la expresión del VEGF (mayor o igual a 200) se encuentra en el 66% de las pacientes con cáncer de cérvix, hallazgo que se relacionó con la positividad del CD31 (encontrado en el 34% de las pacientes) y con la elevación de la TSP1 (65% de los casos) (69). A diferencia de estos resultados nuestro estudio demostró una reducción en la SG para la población que presentaba una expresión alterada del VEGF ($p=0.026$). Estos resultados se confirmaron al demostrar una relación directa y proporcional entre el mayor compromiso vascular medido por la expresión tisular del VEGF, y por la DMV cuantificada según la inmunoreacción del CD31 ($p=0.027$). La elevación del VEGF también se correlacionó en un aumento en el HIF-1 α ($p=0.07$).

Hockel y colaboradores, determinaron que el crecimiento de los carcinomas escamosos del cérvix se acompaña de una hipervascularización en la periferia del estroma y de una hipovascularidad en el núcleo tumoral, punto donde la DMV es inferior a 40 vasos/mm²; este hecho se asoció con la agresividad local de la neoplasia e influenció la SLP y SG en 52 pacientes (70). Estos datos fueron concordantes con los encontrados en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAM) donde se estudiaron 118 pacientes que tuvieron un peor pronóstico al aumentar la DMV sobre un límite de 20 (71). En contraposición, el presente estudio no encontró ninguna relación entre los desenlaces primarios y la alteración de la DMV utilizando un patrón de medición previamente descrito en la literatura.

De acuerdo con el registro institucional de cáncer del INC, en el año 2000 se atendieron 651 pacientes con cáncer de cérvix en esa institución; la mayoría tenía neoplasias del tipo escamocelular, un poco más de la mitad presentaba tumores mayores de 5 cm y estados clínicos IIIB o superiores, motivo por el cual el 53.3% fue tratado con radioterapia asociada o no a quimioterapia con base en platino (sólo el 13% de las mujeres recibieron la quimioterapia de forma regular. Al término del seguimiento, el 66% de las mujeres estaban vivas y el 31.6% había muerto a causa de la enfermedad; la mediana de SG fue de 54.3 meses, superior a la encontrada en nuestro estudio. No obstante, la tercera parte de los casos evaluados por Pardo y colaboradores correspondían con tumores *in situ* y estados tempranos ($n=157$). Al igual que nosotros, la SG de las mujeres tratadas en el

INC se vio afectada por el tamaño tumoral; sin embargo, en dicha cohorte también influyó el nivel educativo máximo alcanzado, el régimen de afiliación al sistema general de seguridad social y el estado tumoral, siendo este último el factor de mayor valor dado que la supervivencia a 5 años en los estados III y IV fue del 37% y 0%, respectivamente. (72)

Los resultados del tratamiento del carcinoma de cérvix localmente avanzado distan de ser óptimos, sin embargo, el desarrollo de la biología molecular tumoral permitirá determinar la presencia de subgrupos que se benefician de intervenciones puntuales, este estudio permite confirmar el valor pronóstico de varios genes relacionados con la supervivencia y proliferación de los tumores escamosos de origen ginecológico, favoreciendo la introducción de nuevas hipótesis a cerca de la utilidad potencial de moléculas dirigidas contra las vías de señalización dependientes del EGFR y de algunos elementos claves en la angiogénesis.

Conclusiones

- Los desenlaces encontrados en la serie son equivalentes a los de otros estudios reportados previamente.
- Tres condiciones influyeron positivamente sobre la supervivencia sin modificar el curso de la supervivencia libre de progresión, la expresión de EGFR, VEGF y el volumen tumoral inicial.
- Estos resultados tienen relación con el pronóstico del cáncer de cérvix localmente avanzado; dos de los genes comprometidos pueden ser controlados con la administración de terapias dirigidas contra la angiogénesis y la vía del factor de crecimiento epidérmico.

Figuras y tablas

Tabla 1. Características de la población en estudio.

Variable	N (%)
Edad (media, DE)	52 (\pm 10)
Edad por estratos	
<65 años	56 (91.8)
>65 años	5 (8.2)
Estado funcional (IK)	
<70	10 (16.4)
>70	37 (60.7)
ND	14 (23.0)
Grado escolaridad	
Primaria	14 (23.0)
Bachiller	9 (14.8)
Vocacional/técnico	13 (21.3)
Posgrado	1 (1.6)
Ninguno	10 (16.4)

ND	14 (23.0)
Antecedente tabaquismo	
No fumador	29 (47.5)
Fumador	12 (19.7)
ND	10 (16.4)
Número de años de exposición al tabaco (media, DE)	12 (\pm 7)
HIV (+)	0
Historia de lesión preneoplásica	
Si	13 (21.3)
No	19 (31.1)
ND	29 (47.5)
Historia de infección por virus del papiloma humano (VPH)	
Si	7 (11.5)
No	26 (42.5)
ND	28 (45.9)
Histología	
Escamoso	58 (95.1)
Adenocarcinoma	2 (3.3)

Adenoescamoso	1 (1.6)
Grado histológico	
Gx	18 (29.5)
G1	10(16.4)
G2	29 (47.5)
G3	4 (6.6)
Tamaño tumoral (media, DE)	6.4 cm (\pm 1.8)
Estado clínico (FIGO)	
IIA	2 (2.3)
IIB	29 (47.5)
IIIA	3 (4.9)
IIIB	23 (37.7)
IVA	2 (3.3)
Desconocido	2 (3.3)
Ganglios pélvicos positivos (biopsia escicional o BACAF)	
Si	5 (8.2)
No evaluados	56 (91.8)

FIGO: Federation International Gynecology Oncology; BACAF: biopsia por aspiración con aguja fina.

Tabla 2. Desenlaces principales después de la administración de la quimiorradiación.

Desenlaces	N (%)
Interrupciones no programadas en la teleterapia	
No	33 (54.1)
Si, por toxicidad	13 (21.3)
Si, por otras razones	12 (19.7)
ND	3 (4.9)
Tratamiento completo con braquiterapia de alta tasa	
Si	46 (75.4)
No	11 (18.0)
ND	4 (6.6)
Número de ciclos de carbo o cisplatino semanal	
1	2 (3.3)
2	3 (4.9)
3	7 (11.5)
4	10 (16.4)
5	16 (26.2)
6	21 (34.4)

ND	2 (3.3)
Estado clínico postratamiento	
Ausencia de tumor	28 (45.9)
Tumor residual	19 (31.1)
Desconocido	14 (23.0)
Estado tomográfico postratamiento	
Respuesta completa	29 (47.5)
Respuesta parcial	15 (24.6)
Enfermedad estable	5 (8.2)
Enfermedad en progresión	3 (4.9)
Desconocido	9 (14.8)
Progresión de la enfermedad	
Si	31 (50.8)
No	23 (37.7)
Desconocido	7 (11.5)

Tabla 3. Expresión proteica en el tejido tumoral embebido en parafina y su relación con los principales desenlaces en estudio.

Variable	Resultado N (%)	SLP (meses, IC95%)	P	SG (meses, IC95%)	P
EGFR					
Alterada	28 (45.9)	3.0 (1.7-5.3)	0.69	20 (12.4-28.2)	0.030
Negativa	26 (42.6)	5.2 (0.3-11.7)		48.5 (36.4-60.7)	
ND	7 (11.5)	-			
DMV					
Normal	21 (34.4)	2.7 (1.8-3.5)	0.60	25.6 (0.8-58.3)	0.66
Alterada	31 (50.8)	6.7 (4.2-8.9)		26.7 (11.0-42.4)	
ND	9 (14.8)	-		-	
VEGF					
Baja	24 (39.3)	3.0 (0.7-5.3)	0.65	58 (44.5-71.5)	0.026
Moderada	10 (16.4)	-		-	
Alta	19 (31.1)	1.2 (0.6-1.8)		18.7 (15.1-22.4)	
Ausente	4 (6.6)	8.0 (4.6-11.4)		26.6 (9.0-44.2)	
ND	4(6.6)	-		-	
HIF					

Alterada	30 (49.2)	4.3 (1.0-7.7)	0.59	24.0 (7.1-42.0)	0.037
Negativa	23 (37.7)	7.0 (4.3-9.7)		52.0 (40.0-63.0)	
ND	8 (13.1)			-	

Tabla 4. Análisis multivariado para la supervivencia global (Modelo de Cox).

Variable	P (IC95%)
Expresión EGFR	0.049 (1.47-3.99)
Densidad microvascular	0.75 (0.30-2.35)
Expresión VGEF	0.038(1.03-2.89)
Expresión HIF	0.15 (0.52-54.50)
Grado histológico	0.11 (0.88-3.06)
Respuesta imaginológica al termino del tratamiento	0.40 (0.97-1.00)

Figura 1. Supervivencia global y libre de progresión en la población general.

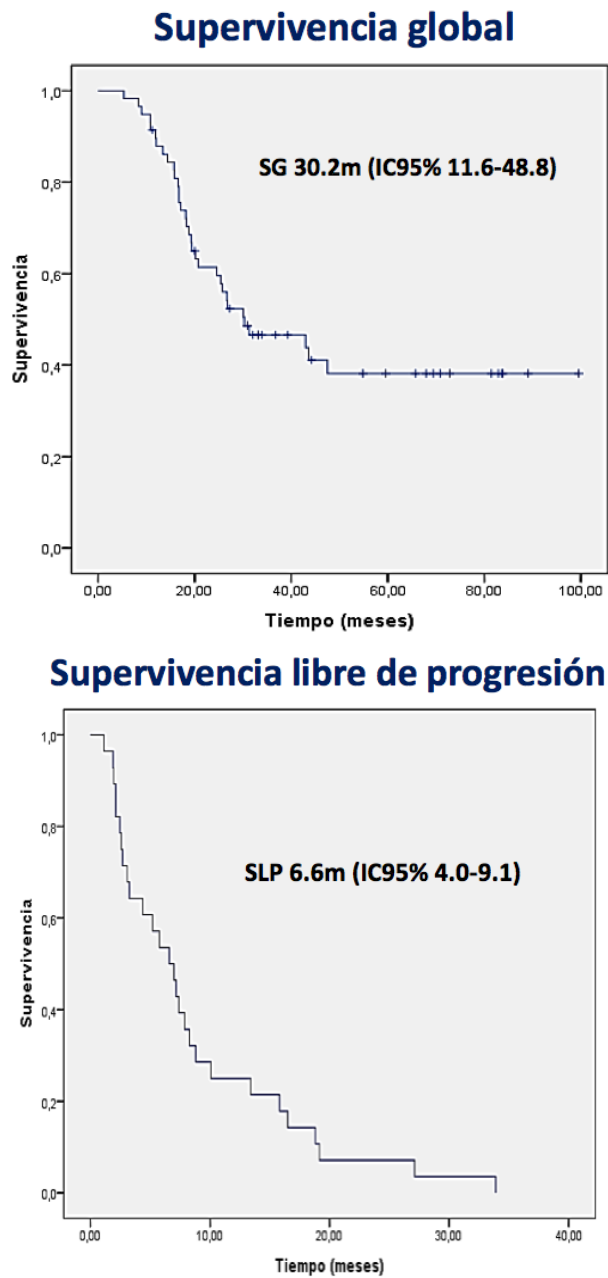


Figura 2. Supervivencia global según el tipo de respuesta a la quimiorradiación.

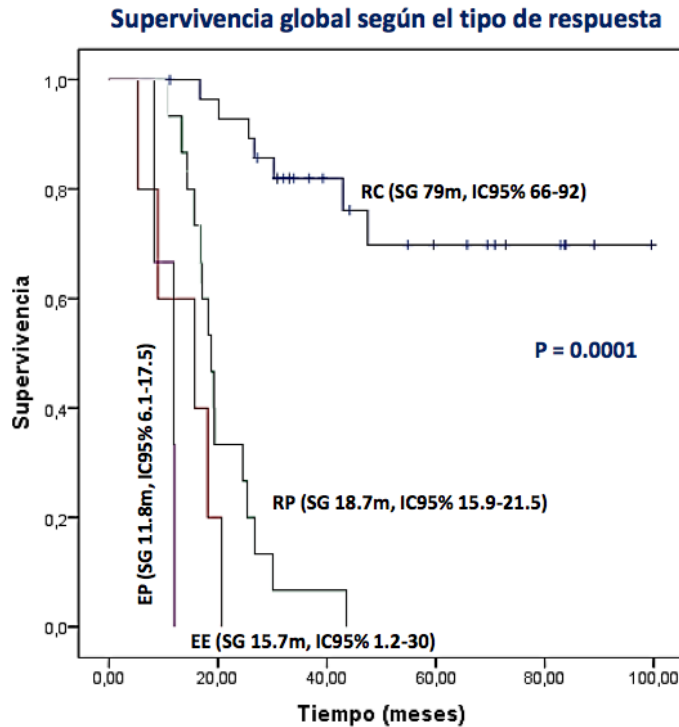


Figura 3. Supervivencia global según el tamaño tumoral (mayor y menor de 6 cm).

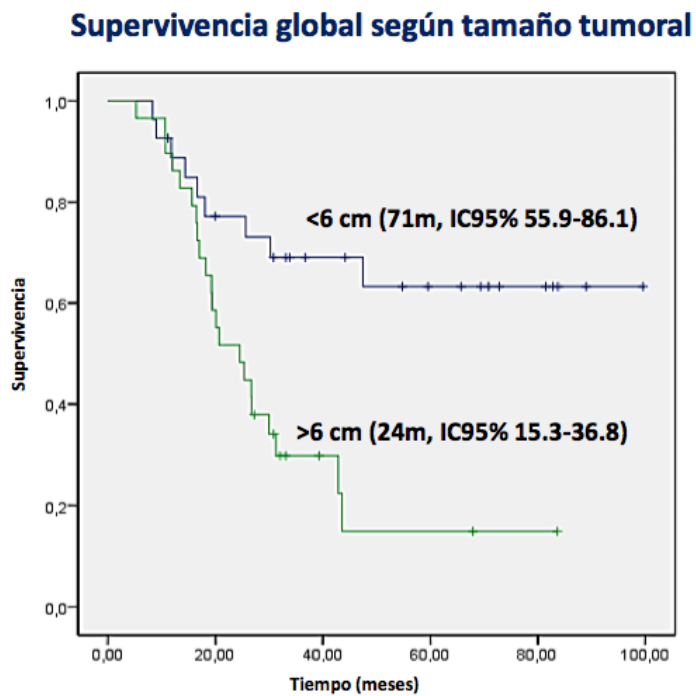


Figura 4. Supervivencia global según la expresión de EGFR.

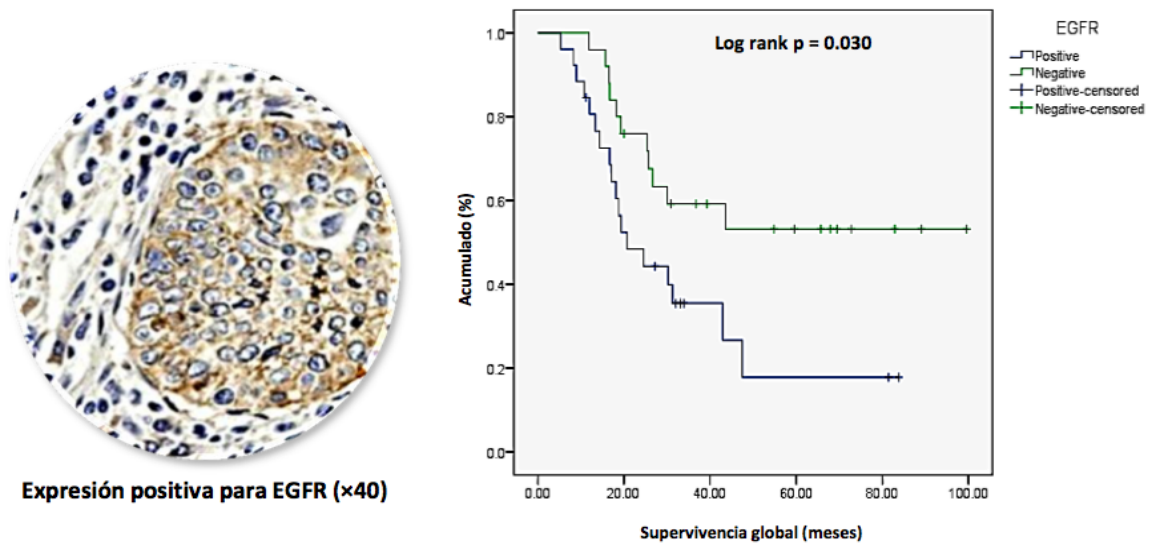


Figura 5. Supervivencia global según la expresión de VEGF.

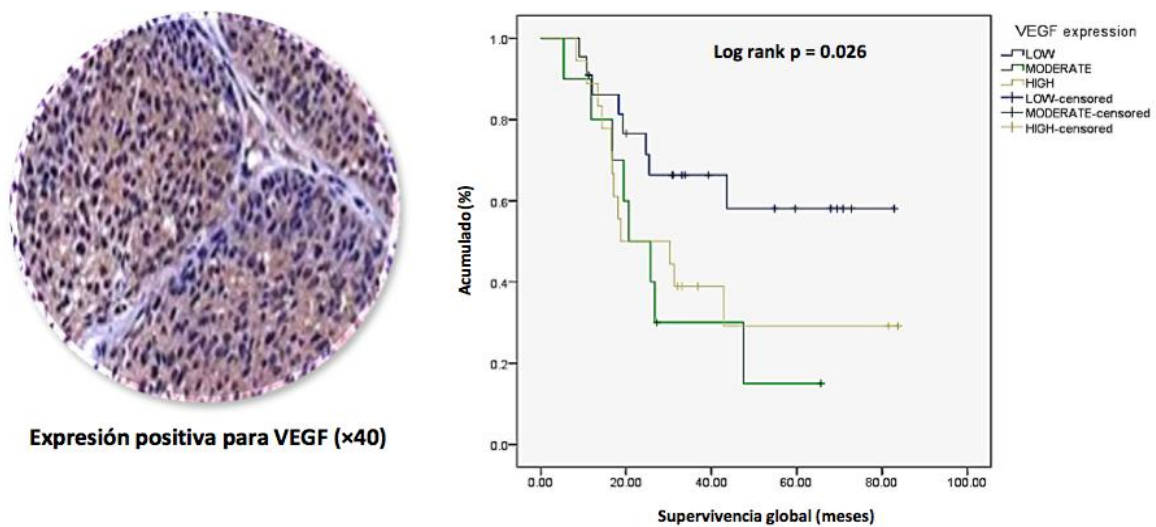


Figura 6. Supervivencia global según la expresión de HIF-1 α .

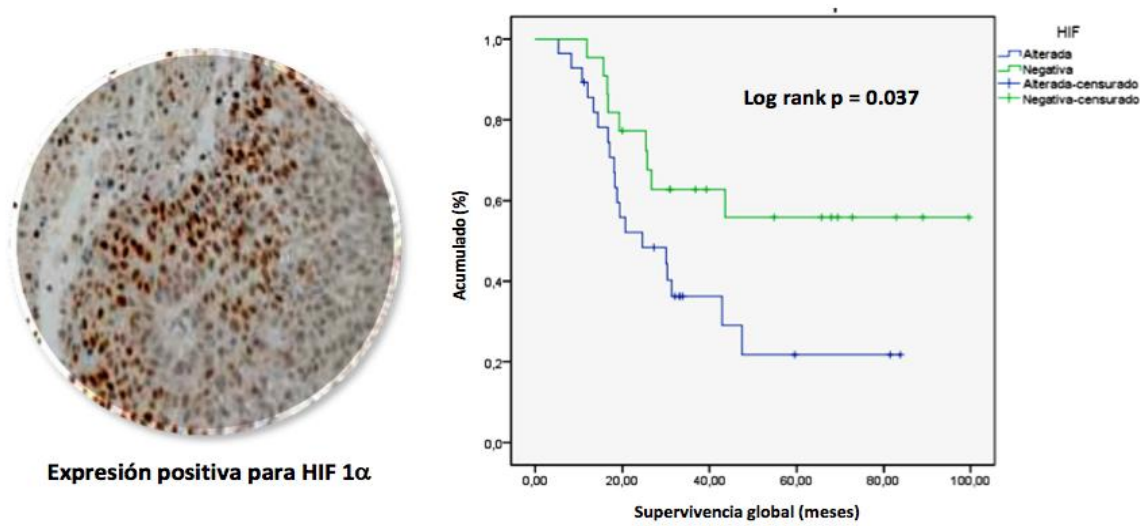
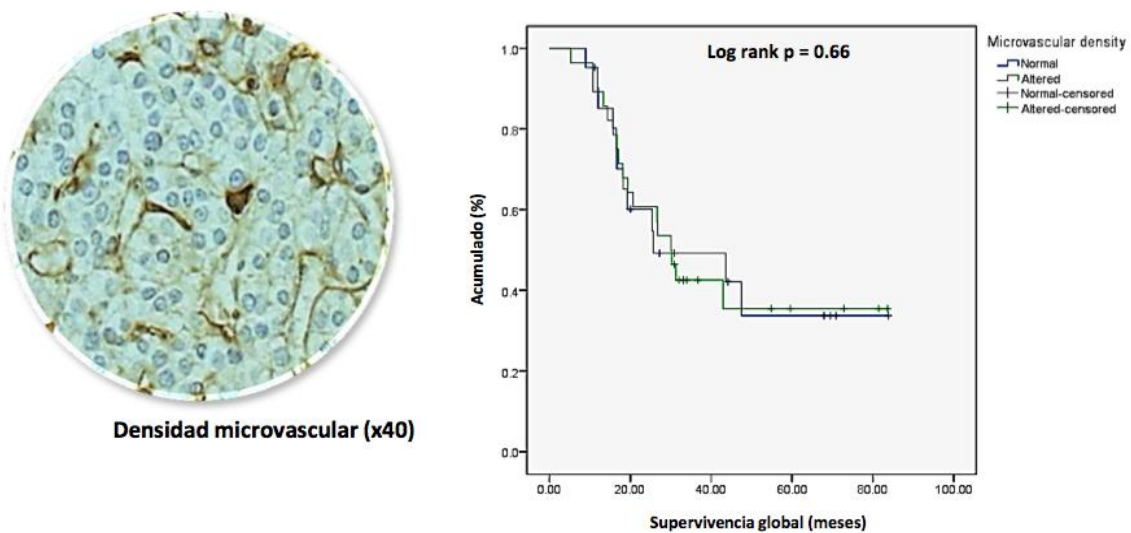


Figura 7. Supervivencia global según la densidad microvascular (DMV).



Agradecimientos

El autor agradece la colaboración de *Teresa Castro* en el proceso de identificación y recolección de la información de los casos incluidos en el estudio.

Referencias

1. Pisani P, Parkin DM, Bray F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999;83:18-29.
2. Frazer IH, Lowy DR, Schiller JT. Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. *Eur J Immunol*. 2007;37 Suppl 1:S148-55.
3. Agosti JM, Goldie SJ. Introducing HPV vaccine in developing countries-key challenges and issues. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1908-10.
4. Monk BJ, Tewari KS. Invasive cervical cancer, in DiSaia PJ, Creasman WT (eds): *Clinical Gynecologic Oncology* (ed 7). Philadelphia, PA, Mosby Publishers, 2007.
5. Robles SC, White F, Peruga A. Trends in cervical cancer mortality in the Americas. *Bull Pan Am Health Org*. 1996;30:290-301.
6. Pabón A. La mortalidad en Colombia 1953-1991. [Mortality in Columbia 1953-1991]. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 1993.
7. Ministerio de Salud (República de Colombia). Mortalidad y años de vida ajustados por discapacidad como medidas de la carga de enfermedad Colombia 1985-1995 [Mortality and DALY's as a measure of burden of disease, Colombia 1985-1995]. Santafé de Bogotá: Imprenta Nacional, 1999.
8. Keys H, Gibbons SK. Optimal management of locally advanced cervical carcinoma. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1996;21:89-92.
9. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999;340:1137-1143.
10. Peters WA III, Liu PY, Barrett II RJ, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with radiotherapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early stage-cancer of the cervix. *J Clin Oncol*. 2000;18:1606-1613.
11. Cancer trials. NCI issues clinical announcement on cervical cancer chemotherapy plus radiation improves survival, <http://www.cancer.gov.newscenter/cervicalcancer.html>.
12. Datta NR, Agrawal S. Does the evidence support the use of concurrent chemoradiotherapy as a standard in the management of locally advanced cancer of

- the cervix, especially in developing countries? Clin Oncol (R Coll Radiol). 2006;18(4):306-12.
13. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Eng J Med. 2003;348:518-527.
 14. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res. 2002;89:213-228.
 15. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2001 Apr 12;344(15):1125-31.
 16. Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. PNAS. 1993;90:3988-3992.
 17. Giuntoli RL 2nd, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, et al. Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. Cancer. 2001;92:2875-2884.
 18. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. Clin Cancer Res. 1996;2:755-762.
 19. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. Gynecol Oncol. 2004;92:873-880.
 20. Ngan HY, Stanley M, Liu SS, Ma HK. HPV and p53 in cervical cancer. J Virol. 1992;66:6237-6245.
 21. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Res. 2000;60:203-212.
 22. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol. 2009;112(3):583-9.
 23. Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, et al. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival. Am J Obstet Gynecol. 1998;178(2):314-9.

24. Rutgers JL, Mattox TF, Vargas MP. Angiogenesis in uterine cervical squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 1995;14(2):114-8.
25. Kainz C, Speiser P, Wanner C, Obermair A, Tempfer C, Sliutz G, et al. Prognostic value of tumour microvessel density in cancer of the uterine cervix stage IB to IIB. *Anticancer Res*. 1995;15:1549-1551.
26. Lee IJ, Park KR, Lee KK, Song JS, Lee KG, Lee JY, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;54:768-79.
27. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, Hammond E, Seaman J, Holden J. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;56(4):922-8.
28. Brahimi-Horn C, Pouyssegur J. The role of the hypoxia-inducible factor in tumor metabolism growth and invasion. *Bull Cancer*. 2006;93(8):E73-80.
29. Auguste P, Lemiére S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Ref Oncol Hematol*. 2005;54(1):53-61.
30. Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 2004;112(7-8):402-12.
31. Zusterzeel PL, Span PN, Dijksterhuis MG, Thomas CM, Sweep FC, Massuger LF. Serum vascular endothelial growth factor: a prognostic factor in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135:283-290.
32. Lu ZH, Wright JD, Belt B, Cardiff RD, Arbeit JM. Hypoxia-inducible factor-1 facilitates cervical cancer progression in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Am J Patol*. 2007;171(2):667-681.
33. Moeller BJ, Dreher MR, Rabbani ZN, Schroeder T, Cao Y, Li CY. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. 2005;8:99-110.
34. Liu J, Zhang J, Wang X, Li Y, Chen Y, Li K, Zhang J, Yao L, Guo G. HIF-1 and NDRG2 contribute to hypoxia-induced radioresistance of cervical cancer Hela cells. *Exp Cell Res*. 2010;316(12):1985-93.
35. Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 α by human papillomaviruses. *Virology*. 2009;387(2):442-8.

36. Dellas K, Bache M, Pigorsch SU, Taubert H, Kappler M, Holzapfel D, et al. Prognostic impact of HIF-1 α expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol.* 2008;184(3):169-74.
37. Burri P, Djonov V, Aebersold DM, Lindel K, Studer U, Altermatt HJ, et al. Significant correlation of hypoxia-inducible factor-1 α with treatment outcome in cervical cancer treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003;56(2):494-501.
38. Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, Mitsuhashi N, Takahashi M, Masuda N, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;60(2):513-21.
39. Hutchison GJ, Valentine HR, Loncaster JA, Davidson SE, Hunter RD, Roberts SA, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2004;10(24):8405-12.
40. Monk BJ, Sill MW, Burger RA, Gray HJ, Buekers TE, Roman LD. Phase II trial of bevacizumab in the treatment of persistent or recurrent squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol.* 2009;27(7):1069-74.
41. Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2010;116(2):181-6.
42. Tan SJ, Juan YH, Fu PT, Yu MH, Lai HC. Chemotherapy with low-dose bevacizumab and carboplatin in the treatment of a patient with recurrent cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2010;31(3):350-3.
43. Takano M, Kikuchi Y, Kita T, Goto T, Yoshikawa T, Kato M, et al. Complete remission of metastatic and relapsed uterine cervical cancers using weekly administration of bevacizumab and paclitaxel/carboplatin. *Onkologie.* 2009;32(10):595-7.
44. Speake G, Holloway B, Costello G. Recent developments related to the EGFR as a target for cancer chemotherapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5(4):343-9.
45. Ghosh S, Liu XP, Zheng Y, Uckun FM. Rational design of potent and selective EGFR tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets.* 2001;1(2):129-40.

46. Noordhuis MG, Eijsink JJ, Ten Hoor KA, Roossink F, Hollema H, Arts HJ, et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo)radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7389-97.
47. Milano G, Magne N. Anti-EGFR and radiotherapy. *Cancer Radiother.* 2004;8:380-2.
48. Nogueira-Rodrigues A, do Carmo CC, Viegas C, Erlich F, Camisão C, Fontão K, et al. Phase I trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced cervical squamous cell cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):6324-9.
49. Ferreira CG, Erlich F, Carmo CC, Viegas C, Cidade IJ, Camisao CC, et al. Erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced squamous cell cervical cancer: A phase II trial. *J Clin Oncol.* 2008;26:5511.
50. National Cancer Institute. Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3.0. URL available from <http://www.fda.gov/cder/cancer/toxicityframe.htm>, Accessed in November 2008.
51. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
52. Kimura S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Hihara J, Yoshida K, Toge T, Chayama K: Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is associated with vascular endothelial growth factor expression and tumour angiogenesis in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2004;40(12):1904-1912.
53. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer.* 1998;78:170-4.
54. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumour angiogenesis and metastasis-Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1-8.
55. <http://www.cancer.gov.co/documentos/Incidencia/Tabla%2084.pdf>
56. Vrdoljak E, Hamm W. Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinoma: state of the art and future directions. *J Clin Oncol.* 2007;25(20):2952-65.
57. Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a

- systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5802-12.
58. Rose PG, Bundy BN. Chemoradiation for locally advanced cervical cancer: does it help? *J Clin Oncol*. 2002;20:891-893.
59. Achary MP, Jaggernauth W, Gross E, Alfieri A, Klinger HP, Vikram B. Cell lines from the same cervical carcinoma but with different radiosensitivities exhibit different cDNA microarray patterns of gene expression. *Cytogenet Cell Genet*. 2000;91:39-43.
60. Grigsby PW, Watson M, Powell MA, Zhang Z, Rader JS. Gene expression patterns in advanced human cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16:562-567.
61. Liang K, Ang KK, Milas L, Hunter N, Fan Z. The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(1):246-54.
62. Baselga J, Norton L, Masui H, Pandiella A, Coplan K, Miller WH Jr, et al. Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(16):1327-33.
63. Fan Z, Baselga J, Masui H, Mendelsohn J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res*. 1993;53(19):4637-42.
64. Goncalves A, Fabbro M, Lhommé C, Gladieff L, Extra JM, Floquet A, et al. A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;108(1):42-6.
65. Herrera FG, Vidal L, Oza A, Milosevic M, Fyles A. Molecular targeted agents combined with chemo-radiation in the treatment of locally advanced cervix cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2008;3(2):111-20.
66. Tewari KS, Monk BJ. Recent achievements and future developments in advanced and recurrent cervical cancer: trials of the Gynecologic Oncology Group. *Semin Oncol*. 2009;36(2):170-80.
67. Bachtary B, Selzer E, Knocke TH, Pötter R, Obermair A. Serum VEGF levels in patients undergoing primary radiotherapy for cervical cancer: impact on progression-free survival. *Cancer Lett*. 2002;179:197-203.
68. Ueda M, Terai Y, Yamashita Y, Kumagai K, Ueki K, Yamaguchi H, et al. Correlation between vascular endothelial growth factor-C expression and invasion phenotype in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 2002;98:335-343.

69. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY, et al. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):583-9.
70. Höckel S, Schlenger K, Vaupel P, Höckel M. Association between host tissue vascularity and the prognostically relevant tumor vascularity in human cervical cancer. *Int J Oncol*. 2001;19(4):827-32.
71. Cantu De León D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13(6):856-62.
72. Pardo C, Cendales R. Survival analysis of cervical cancer patients. *Biomédica*. 2009;29:437-47.